

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019226

International filing date: 22 December 2004 (22.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-425706
Filing date: 22 December 2003 (22.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 24 February 2005 (24.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 2 日
Date of Application:

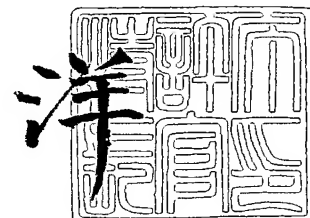
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 2 5 7 0 6
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 2 5 7 0 6]

出 願 人 株式会社三菱化学ヤترون
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

2 0 0 5 年 2 月 1 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 MKI03018P
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/50
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号 株式会社三菱化学ヤトロン内
 【氏名】 小野 智子
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内
 【氏名】 副島 見事
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内
 【氏名】 平嶋 正樹
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内
 【氏名】 森河 亘
【発明者】
 【住所又は居所】 栃木県宇都宮市富士見が丘 1 - 2 5 - 1 1
 【氏名】 坂田 洋一
【特許出願人】
 【識別番号】 000138277
 【氏名又は名称】 株式会社三菱化学ヤトロン
【特許出願人】
 【識別番号】 000173555
 【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所
【代理人】
 【識別番号】 100090251
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 森田 憲一
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 017813
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

フォンヴィルブランド因子分解酵素を定量することを特徴とする、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出方法。

【請求項 2】

前記血栓症が、急性若しくは慢性骨髓性白血病、急性前骨髓球性白血病、全身性エリトマトーデス、肺塞栓、脳硬塞、肝中心静脈閉塞症、急性リンパ球性白血病、血栓性微小血管障害、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、又は深部静脈血栓症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

シャント造設をくり返した慢性透析患者における血栓形成傾向の程度を検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

健常人と比較して、フォンヴィルブランド因子分解酵素濃度の低下を指標とする、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

フォンヴィルブランド因子分解酵素の定量を、フォンヴィルブランド因子分解酵素に特異的に結合する抗体又はその断片を使用する免疫学的手法により行う、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

フォンヴィルブランド因子分解酵素に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出用キット。

【請求項 7】

フォンヴィルブランド因子分解酵素を免疫学的手法により定量することを特徴とする、フォンヴィルブランド因子分解酵素に対する自己抗体の分析方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 フォンヴィルブランド因子分解酵素の測定による血栓症の検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、フォンヴィルブランド因子分解酵素の測定による血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出方法及び検出用キットに関する。本発明では、例えば、フォンヴィルブランド因子分解酵素に対するモノクローナル抗体及び／又はポリクローナル抗体を用いる免疫測定法を利用することができる。

【背景技術】

【0002】

生体内において血管壁の傷害により内皮下組織が露出すると、血流中を流れる血小板が速やかに粘着する。この粘着には血漿中ヒトフォンヴィルブランド因子 (von Willebrand factor; 以下、「vWF」と略記する) が必要とされ、これが引き金となり血小板凝集、細胞内顆粒放出といった一連の血小板活性化過程の後に血栓が形成され、止血が行われる。通常 vWF は分子量 20,000 kDa 以上の巨大分子として血管内皮より血中へ分泌され、そこでメタロプロテアーゼである vWF 分解酵素により切断され、500~20,000 kDa のマルチマーとして血中を循環する。疾患時 (閉塞などにより高ずり応力が生じた場合) においては、vWF の立体構造の変化が起き伸展した構造をとる。この伸展した vWF は血小板凝集能が高いことが知られている。一方で、この伸展した vWF は vWF 分解酵素による分解を受けやすい。しかし、何らかの理由でこの酵素活性が低下している場合、通常認められないような巨大 vWF 分子が過剰に血中に存在し、血小板とより効果的に結合することにより、血管内で血小板の凝集を促進し、微小循環に血栓を形成すると考えられている。このような血小板を主体とする血栓形成は生理的な止血機構に必要不可欠であるが、一方で血栓は心筋梗塞、脳梗塞、脳血栓といった血栓性疾患を引き起こし、社会の高齢化とともに死亡原因の上位を占める深刻な問題となっている。

【0003】

vWF 分解酵素は非常に重篤な致死率の高い血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; 以下、「TTP」と略記する) の発症に関与すること、急性で散発性 TTP では vWF 分解酵素活性を阻害する自己抗体が産生されていること、および家族性 TTP では vWF 分解酵素活性は失活していることが明らかにされていた。しかし vWF 分解酵素自身の同定は 1996 年に一部分が精製されたのみで (非特許文献 1)、全容については 2001 年になるまで成功しなかった。インビトロ (*in vitro*) では 1.5 mol/L 尿素 / 5 mmol/L トリス緩衝液 (pH 8.0) 存在下でないと酵素活性を示さないため長い間物質を同定することが困難であった。近年、血漿 vWF 分解酵素の精製の成功 (非特許文献 2 及び 3)、また cDNA クローニングが行われ、遺伝子は ADAMTS (a disintegrin like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif) ファミリーに属し、ADAMTS 13 と命名された (非特許文献 4 及び 5)。また同時期に家族性 TTP において、vWF 分解酵素の遺伝子; ADAMTS 13 に変異があるため vWF 分解酵素活性が著しく低下していることが明らかとなった (非特許文献 6)。

【0004】

vWF 分解酵素の活性測定法は、従来より、SDS-アガロース電気泳動及びオートラジオグラフィー又はウェスタンブロット法を組み合わせた vWF 巨大マルチマーの検出法が用いられてきた (非特許文献 1)。しかし、本法の測定にはプロテアーゼフリーの vWF を用意しなければならないこと、測定に 3 日を要すること、研究室により結果が異なるなど煩雑な工程を含んでおり、日常の臨床検査としては普及するに至っていない。

また近年、vWF 分解酵素によるフォンヴィルブランド因子の分解部位である A2 ドメインの部分領域を遺伝子組換えにより大腸菌で発現させ、この組換え蛋白質と患者検体を一定時間混合し、その後 SDS 電気泳動とウェスタンブロット法を組み合わせ、検体中の vWF 分解酵素による A2 ドメインの分解産物の検出による vWF 分解酵素の活性測定法が考案された (非特許文献 7)。しかし、本法もまた組換え蛋白質の作製や電気泳動など

の煩雑な工程を含むため一般の検査室での使用には難しいところがある。

【0005】

また、明らかな原因や基礎疾患がなく、免疫学的機序を介した血小板破壊の亢進により血小板減少をきたす疾患は特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) と呼ばれ、その多くは血小板に対する自己抗体により誘発された自己免疫疾患と考えられている。ITP 患者の抗血小板抗体により認識される抗原としては、主として血小板膜タンパク質である GPIIb-IIIa が同定されており、このタンパク質に対する特異抗体の検出法が数多く考案された。その中でも GPIIb-IIIa に対するモノクローナル抗体を用いた抗原キャプチャーアッセイ (antigen capture assay) が広く利用されている。この方法は、特異性が高く偽陽性が少ないことが知られているが、使用可能とされているモノクローナル抗体のほとんどが市販されていないこと、血小板の採取から溶解等の煩雑な操作が必要となるので、簡便なキットの開発及び標準化が必要である。

【0006】

【非特許文献1】エム・フルラン (M. Furlan) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 1996年, 第87巻, p. 4223-4234

【非特許文献2】エイチ・ゲリットッセン (H. Gerritsen) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 2001年, 第98巻, p. 1654-61

【非特許文献3】ケー・フジカワ (K. Fujikawa) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 2001年, 第98巻, p. 1662-6

【非特許文献4】エックス・チェン (X. Zheng) ら, 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」, (米国), 2001年, 第276巻, p. 41059-63

【非特許文献5】ケー・ソエジマ (K. Soejima) ら, 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (The Journal of Biochemistry)」, 2001年, 第130巻, p. 475-80

【非特許文献6】ジー・ジー・レビー (G. G. Levy) ら, 「ネイチャー (Nature)」, (英国), 2001年, 第413巻, p. 488-494

【非特許文献7】ケー・コカメ (K. Kokame) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 2003年, 08, 2861 (インプレス)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

前記のように、血小板凝集が関与した血栓症の原因および血栓症を簡便に、より確実に検出する方法は、いまだなく、かかる検出法の確立が要望されている。

従って、本発明の目的は前記斯界で要望されている血小板凝集が関与した血栓症の血栓形成傾向の検出法を確立することにある。これにより、救命率の上昇又はより病態に沿った治療方針の決定など、これまでにない血栓症の治療を目指した診断法となると考えられる。本発明者らは、前記目的より鋭意研究を重ねた結果、vWF分解酵素に対するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を応用した酵素免疫測定法により、血栓症患者の血漿中におけるvWF分解酵素の濃度が健常人と比べて顕著に低下していることを見だし、ここに本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記課題は、本発明による、フォンヴィルブランド因子分解酵素を定量することを特徴とする、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出方法により解決することができる。

本発明の検出方法の好ましい態様によれば、前記血栓症が、急性若しくは慢性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、全身性エリトマトーデス、肺塞栓、脳硬塞、肝中心静脈閉塞症、急性リンパ球性白血病、血栓性微小血管障害、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、又は深部静脈血栓症である。

また、本発明の検出方法の別の好ましい態様によれば、シャント建設をくり返した慢性

透析患者における血栓形成傾向の程度を検出する。

【0009】

本発明の検出方法の好ましい態様によれば、健常人と比較して、フォンヴィルブランド因子分解酵素濃度の低下を指標とする。

また、本発明の検出方法の更に好ましい態様によれば、フォンヴィルブランド因子分解酵素の定量を、フォンヴィルブランド因子分解酵素に特異的に結合する抗体又はその断片を使用する免疫学的手法により行う。

【0010】

本発明は、フォンヴィルブランド因子分解酵素に特異的に結合する抗体又はその断片を含むことを特徴とする、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出用キットに関する。

更に、本発明は、フォンヴィルブランド因子分解酵素を免疫学的手法により定量することを特徴とする、フォンヴィルブランド因子分解酵素に対する自己抗体の分析方法に関する。

なお、本明細書における用語「分析」（例えば、自己抗体の分析）には、分析対象物質（例えば、自己抗体）の存在の有無を判定する「検出」と、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」とが含まれる。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、例えば、肺塞栓や脳血栓、及び白血病などで代表される血栓症患者の血栓性の程度を検出を可能としたものであり、その臨床的価値は非常に高い。本発明方法によれば、簡便性、迅速性、及び特異性に優れた血栓傾向の程度又は血栓症の診断が可能となる。

特に、vWF分解酵素の定量に免疫学的手法を用いる場合、現行の電気泳動による活性測定法では、測定に3日を要し、またその判定も測定者や測定に使用する試薬等により変動するのに対して、測定時間も3～4時間であり、かつ再現性よく測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

[1] 本発明の検出方法

本発明の検出方法では、フォンヴィルブランド因子分解酵素（vWF分解酵素）の濃度を定量し、健常人のvWF分解酵素濃度と比較することにより、血栓形成傾向の程度を評価することができ、また、血栓症の有無を判定することができる。

本明細書において「フォンヴィルブランド因子分解酵素」とは、フォンヴィルブランド因子（vWF）のA2ドメインに存在するチロシン（842）とメチオニン（843）を特異的に切断し、ADAMTS13とも称されるメタロプロテアーゼである。

【0013】

後述する実施例2に示すように、血小板凝集が関与した血栓症患者では、健常人と比較して、体液試料中に含まれているvWF分解酵素の濃度が統計学的に有意に低下している。従って、本発明の検出方法では、vWF分解酵素の濃度を定量し、健常人のvWF分解酵素濃度と比較して低い場合には、血栓症であると判定することができる。

【0014】

前記血栓症としては、例えば、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia; AML）、慢性骨髄性白血病（chronic myeloid leukemia; CML）、急性前骨髄球性白血病（acute promyelocytic leukemia; APL）、全身性エリトマトーデス（systemic lupus erythematosus; SLE）、肺塞栓、脳硬塞、肝中心静脈閉塞症（veno-occlusive disease; VOD）、急性リンパ球性白血病（acute lymphocytic leukemia; ALL）、血栓性微小血管障害（thrombotic microangiopathy; TMA）、又は深部静脈血栓症（deep vein thrombosis; DVT）等を挙げることができる。前記血栓性微小血管障害（TMA）の代表的な疾患としては、血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP）や溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome; HUS）などが含まれる。

【0015】

TTPは、(1)血小板減少、(2)細小血管障害性溶血性貧血、(3)腎機能障害、(4)発熱、及び(5)動揺性精神神経障害の5大特徴が認められる重篤疾患である。一方、HUSは、(1)血小板減少、(2)細小血管障害性溶血性貧血、及び(3)腎機能障害の3主徴からなる重篤疾患である。病像の類似性からTTPとHUSは共に、TMAとして共通の病態と考えられ、臨床診断上、前記(5)動揺性精神神経障害の有無と、腎障害の重篤の有無とにより、TTPとHUSの鑑別が行われてきた。

しかし、近年、vWF分解酵素活性とそのインヒビター力価の測定法が確立され、TTPとHUSは異なる病態であることが示されたが、測定法や使用する検体の違いにより、その差が明確でないことから、本当に両者が異なる疾患であるか否かという論争が起きている。今後このような論争に終止符をうつためにも、より簡便で病態を正確に判断できる診断マーカーの開発が必須であると考えられる。なお後述の実施例におけるTTP及びHUSについても、診断マーカー測定に基づいたものでなく、臨床診断上分けられている検体であり、また急性期の患者から採取された検体ではなく、血漿交換の治療が施されていることより、便宜上今回の検討ではTMAに両者を分類した。

このようなTTPとHUSの鑑別の状況から、本発明者らは、まずTMAが疑われる患者のvWF分解酵素濃度の低下を指標として微小血管に血栓の存在を予測し、さらにvWF分解酵素濃度の低下の原因が、自己抗体の存在によるものか否かを調べることにより、病態の的確な把握および早期診断による血漿交換などの治療が有効となるのではないかと考えている。よって、該発明によるvWF分解酵素濃度の低下を知ることは、すなわち微小血管に血栓が形成されていることを知る良い手段であると考えられる。

【0016】

また、後述する実施例3に示すように、シャント再建をくり返している患者ではシャント再建を行ったことがない患者にくらべ、vWF分解酵素量が有意に低下しており、シャント再建をくり返す患者では血栓形成傾向が強いことと相関していた。また、透析開始2時間後では、透析後に比べ有意にvWF分解酵素量が低下しており、透析中に血栓性を示し、シャントがつまりやすくなるという臨床観察に一致していた。これらの結果は、vWF分解酵素量の低下と、血栓形成傾向の上昇との間に相関関係があることを示している。従って、本発明の検出方法では、vWF分解酵素の濃度を定量し、健常人のvWF分解酵素濃度と比較して低い場合には、血栓形成傾向が強いと判定することができる。

【0017】

本明細書において、vWF分解酵素の濃度が低いとは、vWF分解酵素の絶対量が少ない場合が含まれるだけでなく、みかけのvWF分解酵素量が少ない場合、例えば、vWF分解酵素に対する自己抗体の存在により、vWF分解酵素と前記自己抗体との複合体が形成され、みかけのvWF分解酵素量が少なくなる場合も含まれる。

vWF分解酵素に対する自己抗体の検出は、2003年、組換えvWF分解酵素を96穴プレートに結合させ、これに検体を添加し、抗ヒトIgGまたはIgMによりプレート上の組換えvWF分解酵素に結合した抗体を検出するという方法が報告された[エフ・シェイフリンガー (F. Sheiflinger) ら, 「ブラッド (Blood)」, (米国), 2003年, 第102巻, p. 3241-3]。しかし、検出された抗体は、vWF分解酵素活性を中和することはできなかったことより、生体内では、vWF分解酵素は内皮細胞や他のレセプター上に結合している可能性が高いので、試験管内では中和活性を示さなかったのかもしれない。今後の検出された自己抗体のエピトープマッピングの解析が待たれる。

我々も、ラテックスに組換えvWF分解酵素を結合させ、ヒト血漿をサンプルとしてラテックスの凝集の有無で自己抗体の存在を検出しようと試みている。該特許法によるvWF分解酵素量の低下及び今後開発予定である自己抗体検出法の組み合わせにより、血小板輸注の可否を早期に決定しなければならないようなTTPなどの疾患においては、早期診断が可能となることが予測される。

【0018】

本発明方法では、vWF分解酵素の定量を、例えば、免疫学的手法又は生化学的手法（

例えば、酵素化学的手法)等により行うことができ、vWF分解酵素に特異的に結合するモノクローナル抗体及び／若しくはポリクローナル抗体又はそれらの断片を利用した免疫測定法により行うことが好ましい。

前記抗体断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFvを用いることができる。以下、抗体(すなわち、免疫グロブリン分子それ自体)を用いた場合に基づいて本発明方法を説明するが、当業者であれば、前記抗体に代えて適宜、抗体断片を使用することが可能である。

【0019】

本発明方法では、異なる2種類以上の抗vWF分解酵素抗体を用いることが好ましく、より具体的には、第1の抗vWF分解酵素モノクローナル抗体と、この第1抗体の結合領域とは別の領域でvWF分解酵素と結合する抗vWF分解酵素モノクローナル抗体(すなわち、第2のモノクローナル抗体)又はポリクローナル抗体との組み合わせを用いることがより好ましい。

抗vWF分解酵素モノクローナル抗体としては、例えば、マウスモノクローナル抗体WH10(IgG1)、WH2-22-1A(IgG1)、WH63.1(IgG1)、WH7-2B(IgG1)、WH14-3(IgG1)、又はWH50-3(IgG1)等を挙げることができ、抗vWF分解酵素モノクローナル抗体の少なくとも一種がマウスモノクローナル抗体WH10(IgG1)、WH2-22-1A(IgG1)、又はWH63.1(IgG1)であることが好ましい。前記第1モノクローナル抗体としては、前記抗体WH10が好ましく、前記第2モノクローナル抗体としては、前記抗体WH2-22-1A又はWH63.1が好ましい。

【0020】

なお、前記マウスモノクローナル抗体WH10、WH2-22-1A、及びWH63.1は、それぞれ、ハイブリドーマ株WH10、WH2-22-1A、及びWH63.1が産生する抗体である。

ハイブリドーマ株WH10及びWH63.1は、それぞれ、2002年(平成14年)9月4日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(あて名:〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)に国際寄託されたものであり、その受託番号は、それぞれ、FERM BP-8174及びFERM BP-8175である。

また、ハイブリドーマ株WH2-22-1Aは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2003年(平成15年)4月22日に国内寄託されたものであり、2003年(平成15年)9月12日から国際寄託に移管されている。国際受託番号(国際受託番号に続く[]内は国内受託番号)は、FERM BP-08483[FERM P-19324]である。

本発明に使用するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体は、免疫原としてvWF分解酵素を用いること以外は、公知の抗体製造法により調製することができる。また、寄託はしていないものの同様操作により得られた所有抗体であるWH7-2B、WH14-3、又はWH50-3も使用することができる。

【0021】

本発明方法において免疫測定法を使用する場合には、例えば、通常のサンドイッチ法による酵素免疫測定法(ELISA法)に従うことができ、あるいは、通常の競合法、サンドイッチ法等によるRIA法、凝集法等に従うこともできる。これら各方法の操作及び手順等は常法に従うことができる。

特に本発明方法は、抗vWF分解酵素モノクローナル抗体を用いた2ステップサンドイッチ法によるのが好ましい。この方法は、例えば代表的には以下のとおり実施することができる。

【0022】

すなわち、適当な担体(例えば、96ウェルプレート等)に固相化させた抗vWF分解酵素モノクローナル抗体を第1抗体として用い、これと、測定対象物質(すなわち、vW

F分解酵素)を含む被検試料(例えば、実験サンプル等の検体)又はvWF分解酵素標準溶液とを、室温にて2時間反応させ〔第1ステップ〕、次いで、第2抗体としての酵素標識抗vWF分解酵素抗体(例えば、マウス抗vWF分解酵素モノクローナル抗体)を前記プレートに加え、室温で1時間程度反応させることにより、前記第2抗体と第1ステップでの反応物(モノクローナル抗体と測定対象物質との反応物)とを反応させ〔第2ステップ〕、次いで発色溶液を加えて発色反応させ、0.5N硫酸にて発色反応を停止させ、得られる発色反応液の吸光度を測定することにより実施される。

【0023】

また別の好ましい方法の形態として、第1ステップの次に、第2抗体としての抗vWF分解酵素ウサギ血清(ウサギ抗vWF分解酵素ポリクローナル抗体)を前記プレートに加え、室温で1時間程度反応させることにより、前記第2抗体と第1ステップでの反応物(モノクローナル抗体と測定対象物質との反応物)とを反応させる。更に抗ウサギIgG抗体等の標識抗体の一定量を前記プレートに加え、室温で1時間程度反応させることも可能である。これらの方法により、被検試料中のvWF分解酵素を定量することができる。

【0024】

前記方法において、用いる各抗体の固相化(不溶化)は、常法に従いこれらの抗体を不溶性担体に物理的又は化学的に結合させることにより実施できる。前記不溶化のための担体としては、例えば、ポリスチレン、セファデックス、イオン交換樹脂、プラスチックチューブ、又はアミノ共重合体等を使用できる。不溶化は、例えば、共有結合法としてのジアゾ法、ペプチド法、若しくはアルキル化法、架橋試薬による担体結合法、イオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法、又はガラスビーズ等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法等によって行なうことができる。

【0025】

前記ポリクローナル抗体としては、抗vWF分解酵素を認識するものである限り、特に限定されるものではなく、前述のモノクローナル抗体の製造において開示した免疫抗原を哺乳動物に投与して生体内に産生される抗血清を利用でき、これは常法に従い採取することができる。

【0026】

また、標識に用いられる標識抗体としては、公知のものを使用することができ、例えば、既に市販のマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、又はウシ等の動物に免疫して得られる抗血清を、適当な酵素、例えば、パーオキシダーゼ(POD)、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、又は酸性ホスファターゼ等で標識した抗イムノグロブリン抗体、例えば、POD標識抗ウサギIgG抗体又はPOD標識抗マウスIgG抗体等を使用することができる。この酵素標識は、常法に従って実施することができる。

【0027】

本発明方法において、被検試料としては、例えば、血漿形態の血液が好ましいが、それ以外にも、例えば、細胞組織液、リンパ液、胸腺水、腹水、羊水、胃液、尿、脾臓液、骨髓液、又は唾液等の各種体液を用いることもできる。また、前記血漿は、クエン酸血漿であることが好ましい。

【0028】

前記測定系に利用される溶媒としては、反応に悪影響を与えない通常の各種溶媒をいずれも利用することができ、pHが約5.0~9.0程度の緩衝液、例えば、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、又は炭酸緩衝液等の利用が好ましい。なお、本発明においては、前記溶媒に、約0.1~10w/v%程度の血清及び/又は約0.1~1M程度のNaClを含ませることが、本発明方法の目的により合致して好ましい。

【0029】

本発明方法では、免疫反応終了後の固相-液相(前記2ステップサンドイッチ法での反応複合体と標識抗体との結合体-非結合標識抗体)の分離を、例えば、遠心分離、濾別、デカンテーション、又は洗浄等の通常の方法により行なうことができる。

【0030】

また、このようにして分離された各物質の酵素標識活性の測定は、使用した酵素の種類に応じて、公知の各種方法に従い実施することができる。その際用いられる発色溶液としては、通常のもの、例えば、パーオキシダーゼを用いる場合には、テトラメチルベンジジン (TMB) や *o*-フェニレンジアミン (OPD) 等を用いることができ、発色反応の停止も常法に従い、例えば、反応液に 0.5 ~ 4 N の硫酸等の適当な酵素活性阻害剤を添加することにより実施することができる。

【0031】

現在、後天性の TTP では、vWF 分解酵素に対する自己抗体が血中の vWF 分解酵素に結合するため、vWF の巨大マルチマーが分解されず、これに血小板が結合することにより血栓が引き起こされることが明らかとなっている。よって、vWF 分解酵素の検出量が低下しているということは、自己抗体により vWF 分解酵素のエピトープがブロックされて、免疫学的に検出できない、すなわち自己抗体の存在を意味する場合がある。あるいは、自己抗体の結合により自己抗体の結合した vWF 分解酵素は生体内で異物として認識され網内系で代謝されるため、結果的に vWF 分解酵素濃度が低下している事も考えられる。今のところ、各種疾患における vWF 分解酵素に対する自己抗体の存在については未知であるが、本発明方法を使用することで、解析がなされるものと考えられる。

またこのことは、現在後天性 TTP の唯一の治療法である血漿交換後に、本発明方法を使用することにより自己抗体発生過程のモニタリングを行うことができ、現在の定期的な血漿交換ではなく、実際の患者の病態にあわせた血漿交換療法が行えることが可能となり、患者の精神的、経済的苦痛を緩和することができると考えられる。さらには、医療経済効果においても多大な貢献をすることが予測される。

【0032】**[2] 本発明の検出用キット**

本発明の検出用キットは、抗 vWF 分解酵素抗体又はその断片を少なくとも含み、異なる 2 種類以上の抗 vWF 分解酵素抗体を含むことが好ましい。本発明の検出用キットは、本発明方法を実施するのに用いることができる。

【0033】

本発明の検出用キットでは、第 1 の抗 vWF 分解酵素モノクローナル抗体と、この第 1 抗体の結合領域とは別の領域で vWF 分解酵素と結合する抗 vWF 分解酵素モノクローナル抗体 (すなわち、第 2 のモノクローナル抗体) 又はポリクローナル抗体との組み合わせを用いることがより好ましい。

前記第 1 抗体は、適当なキャリア (すなわち、固相化担体) に予め固定化されていることが好ましい。また、前記第 2 抗体は標識抗体であることもできるし、あるいは、第 2 抗体を標識化する代わりに、第 2 抗体に対する抗体に標識を結合させた標識抗体を更にキットに追加することもできる。

【0034】

前記モノクローナル抗体を含む試薬中には、安定化剤、例えば、グリセロール又はウシ血清タンパク質等を添加存在させることもできる。この抗体試薬は、液状品であっても、凍結乾燥したものであることもでき、この場合試薬中に水溶性又は水と混和し得る溶媒を含有させることもできる。更に、抗体試薬には、再構成された試薬系を一定の pH に保つための緩衝液や、試料が悪化するのを防止するための保存剤を配合することができる。緩衝液としては、本発明方法を実施する際に pH を約 5.0 ~ 9.0 とするものを用いることが好ましい。また、再構成剤は、好ましくは水を含んだものであるが、前記水の一部又は全部を水と混和し得る溶媒で置き換えることもできる。この水と混和し得る溶媒としては、公知の溶媒、例えば、グリセリン、アルコール類、又はグリコールエーテル類等を例示することができる。

【実施例】**【0035】**

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定する

ものではない。

【0036】

《実施例1: vWF分解酵素の定量》

(a) モノクローナル抗体の組み合わせ: vWF分解酵素のサンドイッチ酵素免疫測定法
vWF分解酵素を免疫原として取得した6種類の抗vWF分解酵素モノクローナル抗体
(WH10、WH2-22-1A、WH63.1、WH7-2B、WH14-3、及びWH50-3)の中から、以下の手順に従って、測定に最も適切な抗体の組合せを調べた。

【0037】

すなわち、抗vWF分解酵素モノクローナル抗体をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)にて $2\mu\text{g/mL}$ に希釈し、96穴EIAプレート(ヌンク社製)に各ウェル $100\mu\text{L}$ ずつ添加し、 4°C にて一晩コーティングした。次に過剰の抗体をPBSで洗浄除去したのち、2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBSを各ウェル $250\mu\text{L}$ ずつ添加し、 4°C で一晩ブロッキングを行った。ブロッキング液を0.1%Tween20含有PBS(PBST)にて洗浄除去したのち、 $100\mu\text{L}$ の検体(正常ヒトプール血漿)又は精製vWF分解酵素抗原より調製した標準品を添加し、室温にて2時間反応を行った。PBSTで反応液を洗浄除去したのち、 $1\mu\text{g/mL}$ ビオチン標識抗vWF分解酵素モノクローナル抗体 $100\mu\text{L}$ を添加し、室温にて1時間反応を行った。反応後、前記と同様に洗浄を行ったのち、0.1 $\mu\text{g/mL}$ ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(バイオラッド社製)溶液 $100\mu\text{L}$ を添加し、室温にて1時間反応を行い、洗浄後、テトラメチルベンジジン(TMB)溶液/過酸化水素溶液(KPL社)を各ウェル $100\mu\text{L}$ 添加し、室温にて15分間反応させた。次にマイクロプレート用比色計で 450nm の吸光度を測定した。

【0038】

この結果、モノクローナル抗体のいずれの組み合わせも測定が可能であったが、モノクローナル抗体WH10を固定化抗体としてコーティングに用い、モノクローナル抗体WH2-22-1A又はWH63.1を2次抗体として用いる組合せが最も高感度な測定を可能とする組合せであった。

【0039】

(b) モノクローナル抗体の酵素標識

抗体WH2-22-1A及びWH63.1をImagawaらの方法[Imagawa et al. (1982) J. Appl. Biochem., 4, 41]によりペルオキシダーゼで標識を行った。

【0040】

(c) モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法

抗vWF分解酵素モノクローナル抗体WH10を $2\mu\text{g/mL}$ の濃度で96穴EIAプレート(ヌンク社製)にコーティングを行い、標準品として正常ヒトプール血漿を用い、2次抗体として実施例1(b)でペルオキシダーゼ標識したWH2-22-1A又はWH63.1、基質溶液としてTMB溶液/過酸化水素溶液(KPL社)、反応停止液として0.5N硫酸溶液を用いて、実施例1(a)と同様にして精製vWF分解酵素の測定を行った。測定は 450nm の吸光度を測定した。

結果を図1に示す。図1におけるY軸の単位は、吸光度(450nm)である。正常ヒトプール血漿を1Unit(U)と定義すると、図1に示すように、0.03U以上のvWF分解酵素を正確に定量することが可能であった。

【0041】

(d) モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組み合わせ: vWF分解酵素のサンドイッチ酵素免疫測定法

抗vWF分解酵素モノクローナル抗体WH10をPBSにて $2\mu\text{g/mL}$ に希釈し、96穴EIAプレート(ヌンク社製)に各ウェル $100\mu\text{L}$ ずつ添加し、 4°C にて一晩コーティングした。次に過剰の抗体をPBSで洗浄除去したのち、25%ブロッカー(大日本製薬社)を含むPBSを各ウェル $250\mu\text{L}$ ずつ添加し、室温で2時間ブロッキングを行った。ブロッキング液を吸引除去したのち、 $100\mu\text{L}$ の正常ヒトプール血漿を添加

し、室温にて2時間反応を行った。P B S Tで反応液を洗浄除去したのち、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 ν WF分解酵素ポリクローナル抗体 $100 \mu\text{L}$ を添加し、室温にて1時間反応を行った。反応後、前記と同様に洗浄を行った後、 10000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体（バイオラッド） $100 \mu\text{L}$ を添加し、室温にて1時間反応を行った後、前記と同様に洗浄を行った後、TMB溶液／過酸化水素溶液（K P L社）を各ウェル $100 \mu\text{L}$ 添加し、室温にて5分間反応させた後、 0.5N 硫酸を $100 \mu\text{L}$ 添加した。次にマイクロプレート用比色計で 450nm の吸光度を測定した。

【0042】

結果を図1に示す。図1における記号「P o A b」は、ポリクローナル抗体を意味する。正常ヒトプール血漿を1 Uと定義すると、図1に示すように、この抗体の組み合わせによっても、 0.03U 以上の ν WF分解酵素を正確に定量することが可能であった。

【0043】

《実施例2：各種疾患群における ν WF分解酵素濃度の比較》

実施例1（c）及び（d）に記載した組合せのサンドイッチ酵素免疫測定法により、血漿中 ν WF分解酵素の定量を行った。この定量においては、正常ヒトプール血漿を標準物質として用いて、これを1 Uとした。

【0044】

抗体WH10及び抗体WH2-22-1Aの組み合わせを用いた場合の結果を図2に、抗体WH10及び抗体WH63.1の組み合わせを用いた場合の結果を図3に、抗体WH10及びポリクローナル抗体の組み合わせを用いた場合の結果を図4に、それぞれ示す。また、健常人及び各種疾患群における ν WF分解酵素量の比較をまとめた結果を、表1に示す。

【0045】

図2～図4及び表1における各記号「AML」、「APL」、「CML」、「TMA（TTP／HUS）」、「ALL」、「SLE」、及び「DVT」は、それぞれ、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia）、急性前骨髄球性白血病（acute promyelocytic leukemia）、慢性骨髄性白血病（chronic myeloid leukemia）、血栓性微小血管障害（thrombotic microangiopathy）〔血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura）及び溶血性尿毒症症候群（hemolytic uremic syndrome）を含む〕、急性リンパ球性白血病（acute lymphocytic leukemia）、全身性エリトマトーデス（systemic lupus erythematosus）、及び深部静脈血栓症（deep vein thrombosis）を意味する。また、表1における各記号「MEAN」、「SEM」、及び「normal」は、それぞれ、平均値、標準誤差、及び健常人を意味する。図2～図4におけるY軸の単位は、正常ヒトプール血漿の希釈列にて作製した検量線から算出したUnitである。

【0046】

測定した健常人12例の ν WF分解酵素濃度の平均値に対して、各疾患群の ν WF分解酵素濃度の平均値は、いずれの抗体の組み合わせによる測定結果においてもこれよりも有意に低い値を示した。また、具体的データは示さないが、肝中心静脈閉塞症（veno-occlusive disease；VOD）患者においても、 ν WF分解酵素濃度が健常人よりも低値であることを確認している。

【0047】

【表1】

第2抗体	疾患群 N =	normal										脳梗塞				DVT	
		12	31	10	4	15	11	17	18	12	7	ALL	肺塞栓	17	18	12	7
WH2-22-1	MEAN	1.027	0.555	0.431	0.597	0.363	0.616	0.711	0.659	0.611	0.584						
	SEM	0.028	0.110	0.029	0.005	0.044	0.147	0.104	0.069	0.052	0.074						
	p<	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.010	0.002	0.001	0.001	0.001						
WH63	MEAN	1.095	0.585	0.623	0.439	0.347	0.471	0.657	0.573	0.617	0.543						
	SEM	0.205	0.219	0.184	0.012	0.027	0.073	0.145	0.131	0.032	0.039						
	p<	-	0.005	0.050	0.050	0.001	0.001	0.050	0.005	0.005	0.010						
POAb	MEAN	0.902	0.614	0.588	0.629	0.432	0.677	0.742	0.639	0.714	0.714						
	SEM	0.004	0.082	0.092	0.002	0.056	0.133	0.086	0.076	0.049	0.052						
	p<	-	0.001	0.010	0.001	0.001	0.067	0.050	0.001	0.020	0.077						

【0048】

《実施例3：慢性透析患者におけるシャント再建の有無による透析前、透析開始2時間後、透析後のvWF分解酵素量の推移》

シャント再建を繰り返し行った慢性透析患者由来の血漿と、シャント再建を行ったこと

がない慢性透析患者由来の血漿とを用いて、実施例 1 (c) に記載した組合せの内、抗体 WH 10 及び抗体 WH 2-22-1A の組み合わせを用いたサンドイッチ酵素免疫測定法により、血漿中 vWF 分解酵素の定量を行った。結果を図 5 に示す。図 5 における Y 軸の単位は、正常ヒトプール血漿の希釈列にて作製した検量線から算出した Unit である。また、図 5 における記号「 $PLT < 10^5$ 」は、血小板数が $1 \times 10^5 / \mu L$ 未満であることを意味する。

【0049】

シャント再建をくり返している患者では、シャント再建を行ったことがない患者に比べ、vWF 分解酵素量が有意に低下しており、シャント再建をくり返す患者では血栓形成傾向が強いことと相関していた。また透析開始 2 時間後では、透析後に比べ有意に vWF 分解酵素量が低下しており、透析中に血栓性を示し、シャントがつまりやすくなるという臨床観察に一致していた。

この結果、これらのことから、本発明方法によれば、血栓症患者の血栓の程度の検出が行い得ることは勿論のこと、シャント再建をくり返す慢性透析患者において、透析後の血栓性の程度も容易にモニタリングすることが可能であり、シャント閉塞の予知、予後の経過の観察をも行い得る利点のあることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0050】

本発明は、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出の用途に適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図 1】モノクローナル抗体の組み合わせ、又はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組み合わせを用いた場合の検量線を示すグラフである。

【図 2】vWF 分解酵素に特異的に結合するモノクローナル抗体 WH 10 及びモノクローナル抗体 WH 2-22-1A を用いた場合の、健常人及び各種疾患群における vWF 分解酵素量を比較した結果を示すグラフである。

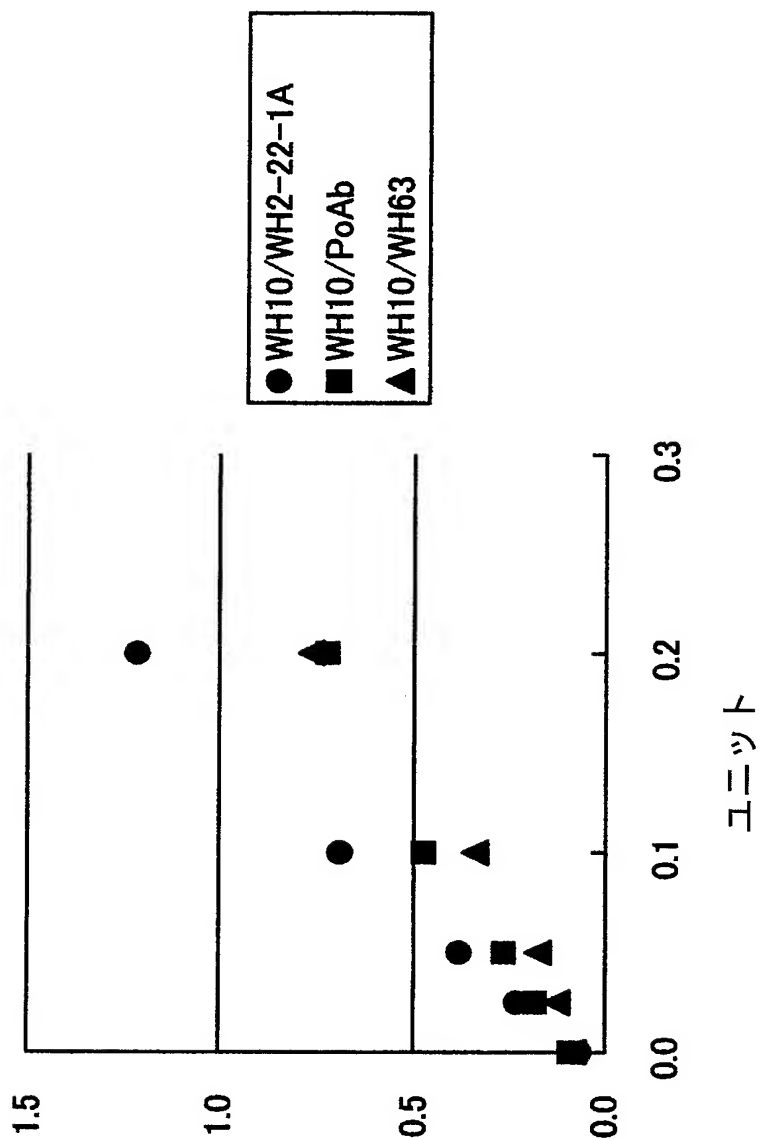
【図 3】vWF 分解酵素に特異的に結合するモノクローナル抗体 WH 10 及びモノクローナル抗体 WH 63.1 を用いた場合の、健常人及び各種疾患群における vWF 分解酵素量を比較した結果を示すグラフである。

【図 4】vWF 分解酵素に特異的に結合するモノクローナル抗体 WH 10 及びポリクローナル抗体を用いた場合の、健常人及び各種疾患群における vWF 分解酵素量を比較した結果を示すグラフである。

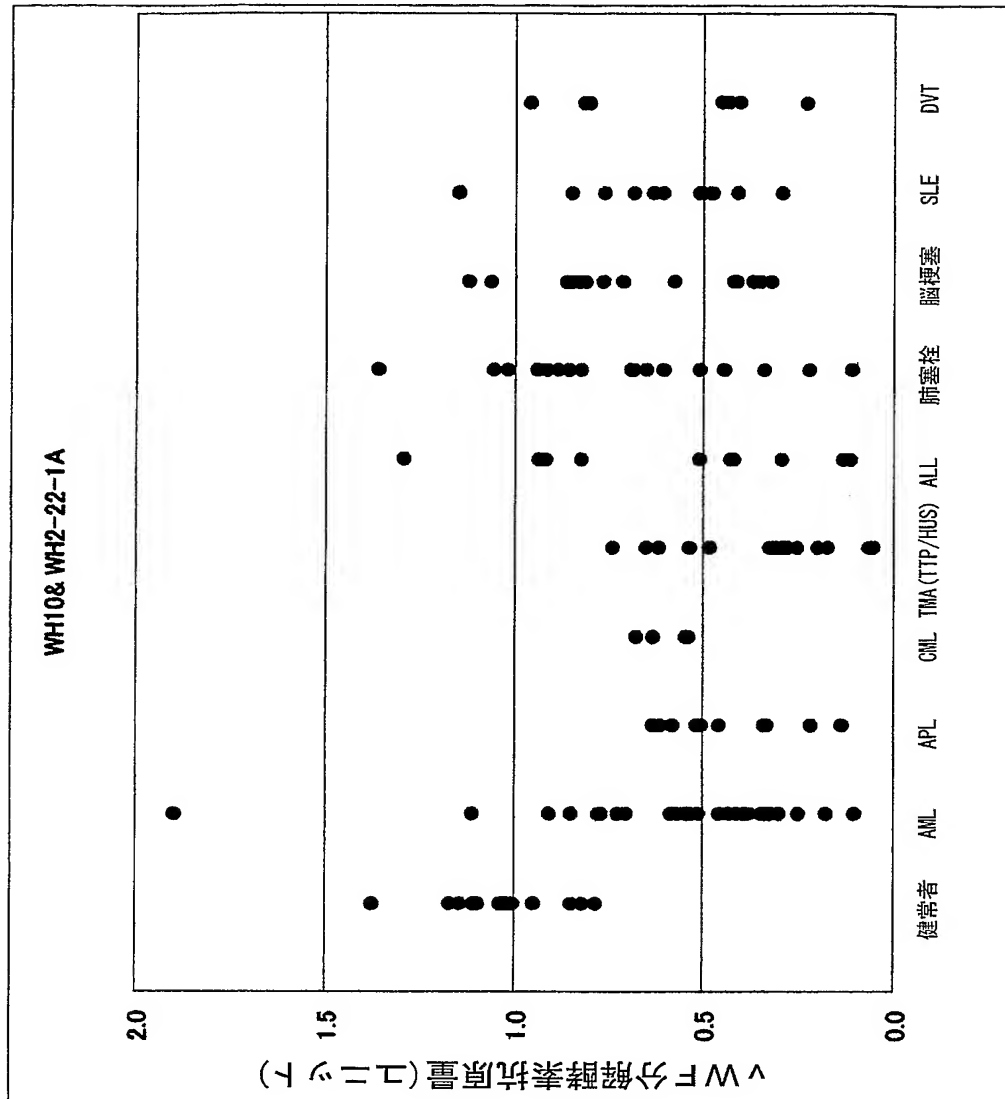
【図 5】vWF 分解酵素に特異的に結合するモノクローナル抗体 WH 10 及びモノクローナル抗体 WH 2-22-1A を用いた場合の、慢性透析患者におけるシャント再建の有無による透析前、透析開始 2 時間後、及び透析後の vWF 分解酵素量の推移を示すグラフである。

【書類名】 図面

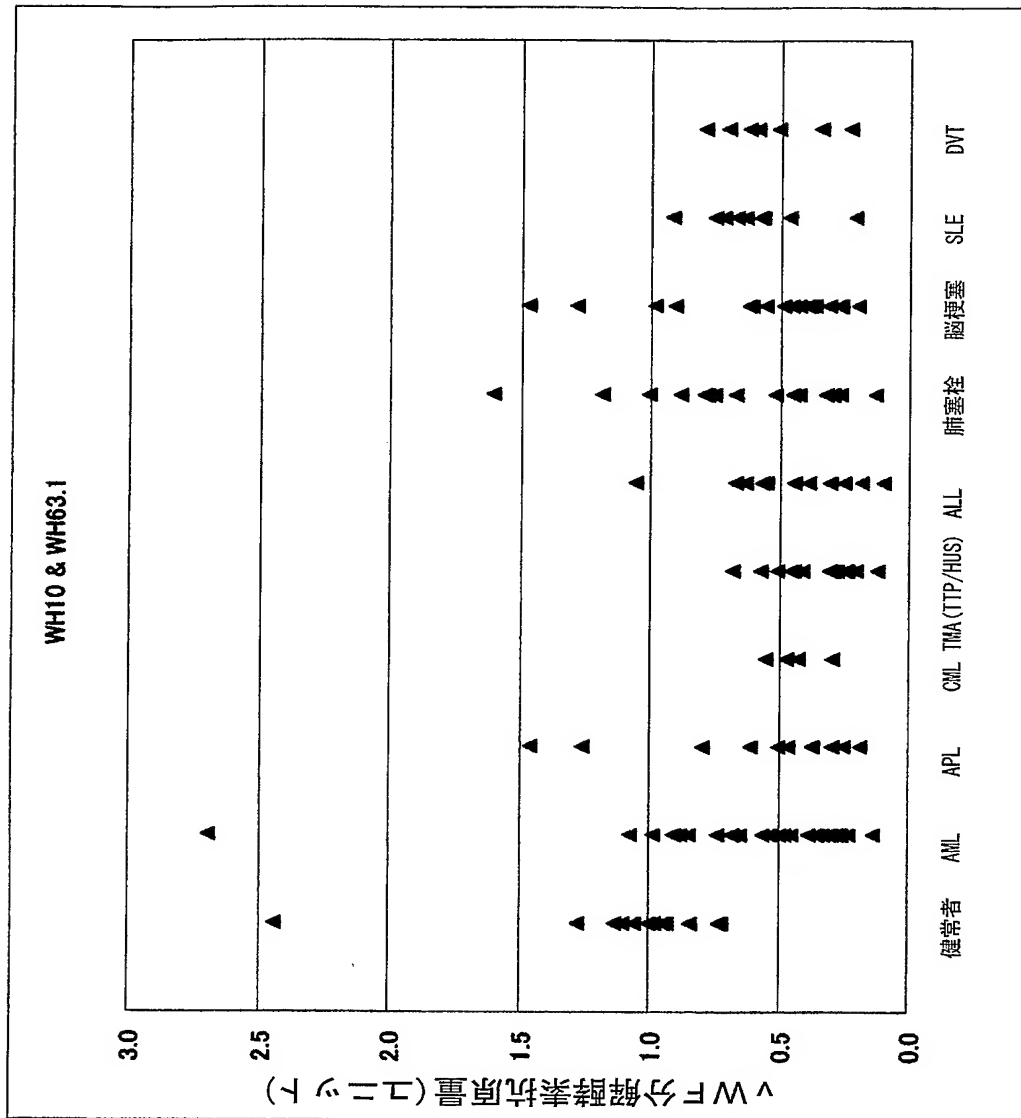
【図 1】



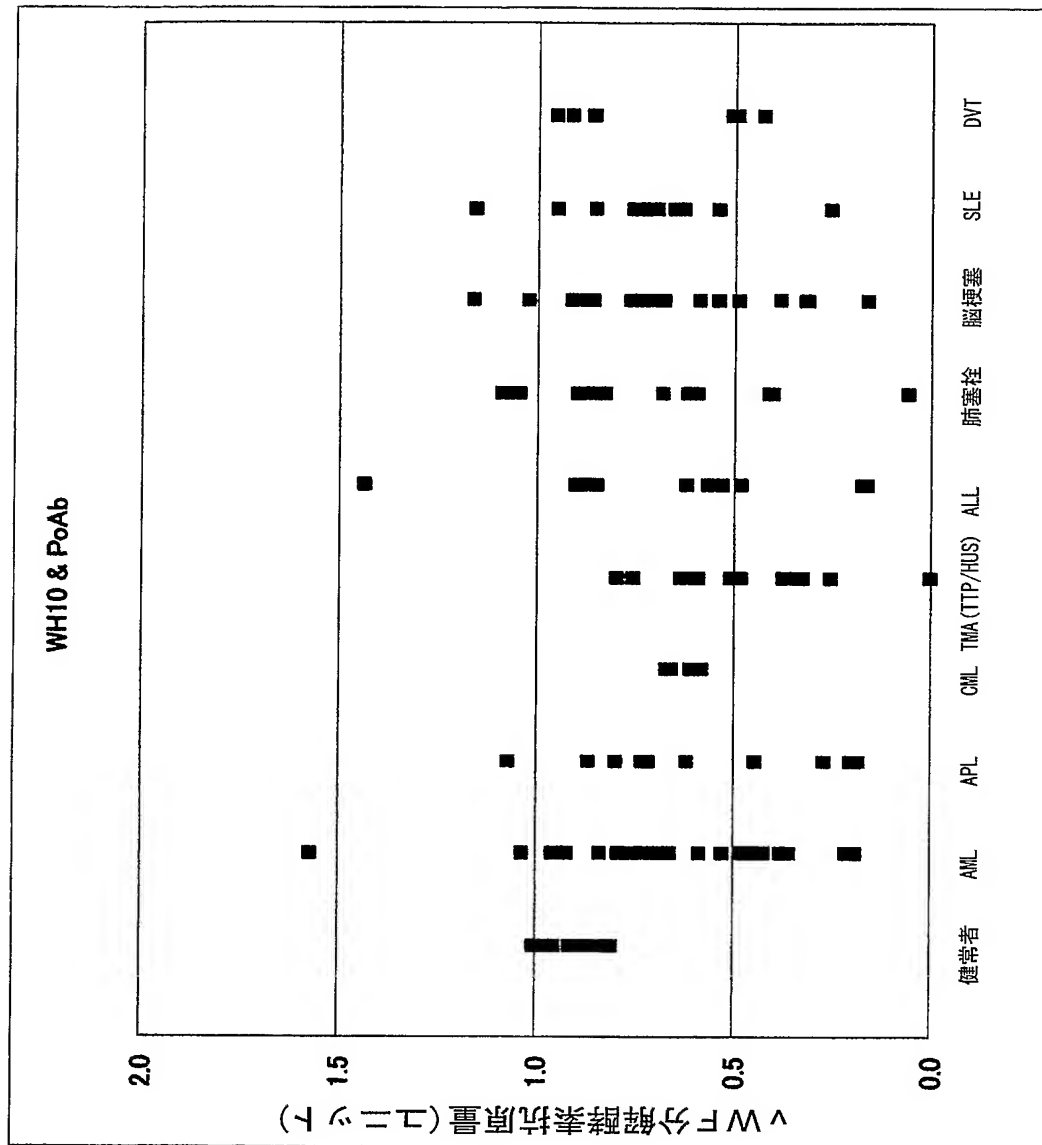
【図 2】



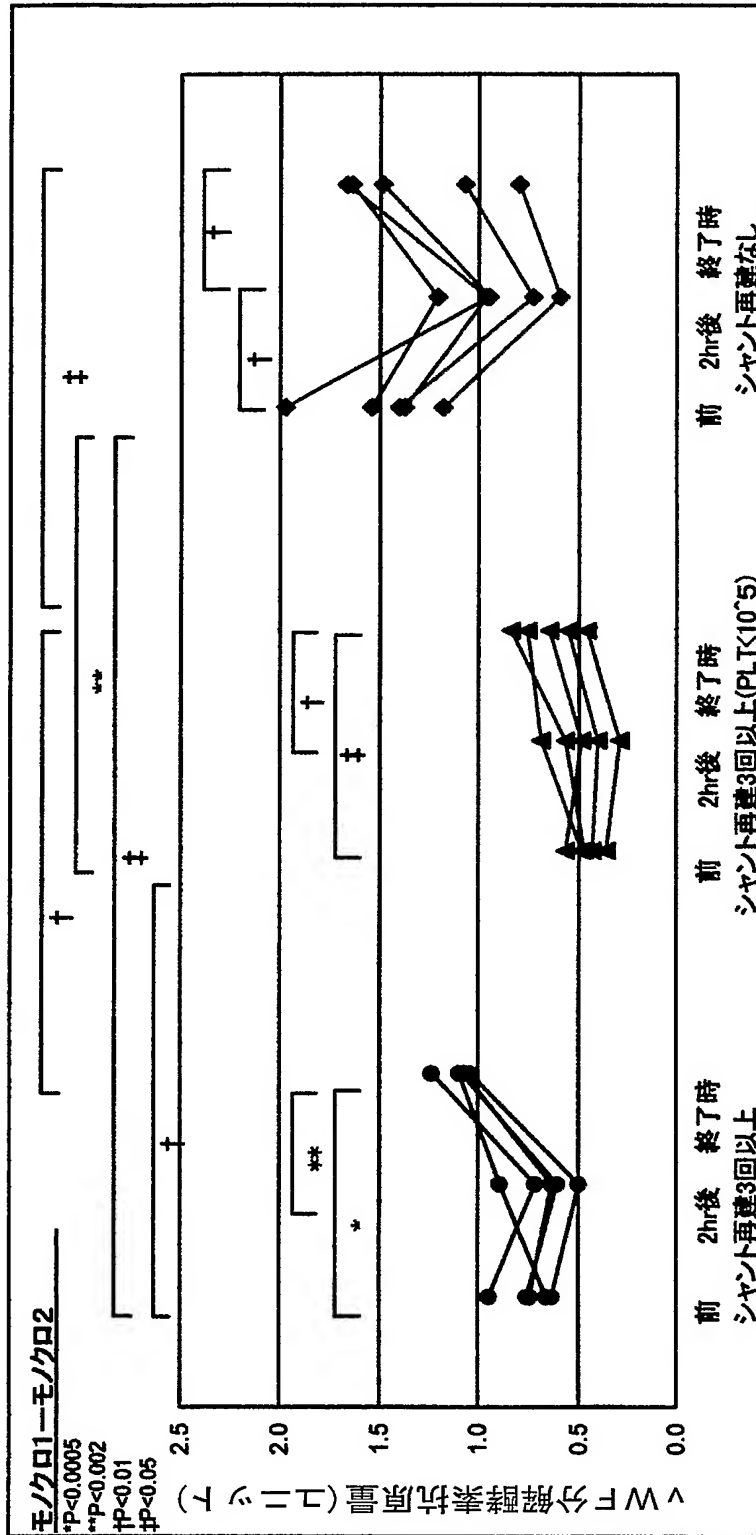
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便性、迅速性、及び特異性に優れた、血栓形成傾向の程度又は血栓症の検出方法及び検出用キットを提供する。

【解決手段】 前記検出方法では、フォンヴィルブランド因子分解酵素を定量する。前記検出用キットは、フォンヴィルブランド因子分解酵素に特異的に結合する抗体又はその断片を含む。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-425706
受付番号	50302111530
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成16年 1月14日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年12月22日

特願 2 0 0 3 - 4 2 5 7 0 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 3 8 2 7 7]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 7 月 1 6 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号

氏 名

株式会社三菱化学ヤトロン

特願 2 0 0 3 - 4 2 5 7 0 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 7 3 5 5 5]

1 . 変更年月日

1 9 9 6 年 3 月 4 日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所